

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019694

International filing date: 22 December 2004 (22.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-289939
Filing date: 01 October 2004 (01.10.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 17 March 2005 (17.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

PCT/JP 2004/019694

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

26. 1. 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 1 0 月 1 日
Date of Application:

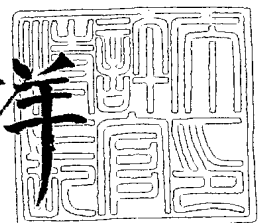
出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 2 8 9 9 3 9
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 4 - 2 8 9 9 3 9]

出 願 人 大 日 本 製 薬 株 式 会 社
Applicant(s):

2 0 0 5 年 3 月 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



出証番号 出証特 2 0 0 5 - 3 0 1 8 2 9 6

【書類名】 特許願
【整理番号】 H16-18
【提出日】 平成16年10月 1日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 33/53
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県八千代市大和田新田 5 9 - 5 6
 【氏名】 伊藤 幸治
【発明者】
 【住所又は居所】 愛知県西春日井郡師勝町大字久地野字権現 9 2 番地の 1
 【氏名】 早川 忍
【発明者】
 【住所又は居所】 兵庫県明石市魚住町中尾 5 5 2 - 2 番 4 0 3 号
 【氏名】 舟岡 宏幸
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府寝屋川市東大利町 1 8 - 2 シティコート寝屋川 2 0 6
 【氏名】 細江 宏彰
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府吹田市山田西 3 丁目 2 2 - 7 2
 【氏名】 西村 誠
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府泉南郡岬町淡輪 3 6 3 1 - 2 4
 【氏名】 大軽 靖彦
【発明者】
 【住所又は居所】 和歌山県和歌山市湊北町 1 丁目 4 1 番地
 【氏名】 薬王 郁久
【特許出願人】
 【識別番号】 000002912
 【氏名又は名称】 大日本製薬株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100124637
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 松尾 まゆみ
 【電話番号】 06-6337-5931
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2003-434618
 【出願日】 平成15年12月26日
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 058883
 【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0307414

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

アレルギーで感作されたモルモットの血液から分離され、SDS-PAGEにより単一の主バンドを得るのに十分な純度をもつ本質的に精製された下記性状を有するモルモット免疫グロブリンEからなる画分；

- (1) 前記主バンドの分子量は約200kDaである、
- (2) 前記主バンドは還元性SDS-PAGEにより2つに分離され、分離後の各バンドの分子量は約70kDa及び約30kDaである、
- (3) モルモット免疫グロブリンEを特異的に認識することができる抗体を製造するための抗原として使用できる、
- (4) モルモットにおけるPCA反応が陽性である、
- (5) 実質的にモルモット免疫グロブリンGを含有しない。

【請求項 2】

アレルギーが卵白アルブミンである請求項1に記載のモルモット免疫グロブリンEからなる画分。

【請求項 3】

請求項1又は2に記載の免疫グロブリンEからなる画分でもってヒト以外の動物を免疫して製造されるモルモット免疫グロブリンEを特異的に認識することができる抗体。

【請求項 4】

抗体がモノクローナル抗体である請求項3に記載のモルモット免疫グロブリンEを特異的に認識することができる抗体。

【請求項 5】

請求項3又は4に記載の抗体を含むモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬。

【請求項 6】

請求項3又は4に記載の抗体及び酵素標識された前記抗体を含むモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬。

【請求項 7】

免疫測定用試薬がサンドイッチ酵素結合免疫固相測定法を実施するための試薬である請求項5又は6に記載のモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬。

【請求項 8】

固相化された請求項3又は4に記載の抗体及び標識物質により標識された卵白アルブミンを含むモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬。

【請求項 9】

固相化された卵白アルブミン及び標識物質により標識された請求項3又は4に記載の抗体を含むモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬。

【請求項 10】

標識物質が酵素である請求項8又は9に記載のモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬。

【請求項 11】

モルモット免疫グロブリンEが卵白アルブミンを認識する免疫グロブリンEである請求項8～10のいずれかに記載の免疫測定用試薬。

【書類名】明細書

【発明の名称】モルモット免疫グロブリン E からなる画分及び抗体

【技術分野】

【0001】

本発明は、特定の性状を有する本質的に精製されたモルモット免疫グロブリン E (以下「I g E」ということもある) からなる画分に関する。また本発明は、前記画分をヒト以外の動物に免疫して製造されるモルモット I g E を特異的に認識することができる抗体 (以下「抗モルモット I g E 抗体」ということもある) 及び該抗体を含むモルモット I g E の免疫測定用試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

生体内に異物が侵入した場合、それを排除しようとして免疫反応が起こる。この免疫反応が過剰になった結果、生体に対して種々の病的症状をもたらす病態をアレルギーという。現在、乳幼児を中心としてアトピー性皮膚炎や喘息に代表される種々のアレルギー疾患患者が激増し、社会問題となっている。これらのアレルギー疾患の多くは、個々のアレルゲン (抗原) に対する I g E (抗体) が過剰に産生されることによって発症する I 型 (即時型) アレルギーである。

【0003】

I 型アレルギーにおける I g E の産生調節メカニズムの解明や、アレルギーを抑制する薬物の研究・開発が進められている。I g E の関与が大きいこのような I 型アレルギーの実験現場では、例えば、受動皮膚アナフィラキシー反応 (passive cutaneous anaphylaxis、以下「PCA 反応」という) に代表されるように実験動物としてモルモットが使用されることが多い。

【0004】

非特許文献 1 には、寄生虫を感染させたモルモットの血清から I g E が豊富に含まれる画分を分離して、該画分を抗原としてウサギに免疫して製造された抗モルモット I g E 抗体が記載されている。しかしながらここに記載されているモルモット I g E を豊富に含む画分は、他のクラスの免疫グロブリン、例えば免疫グロブリン G も相当量含んでいると考えられる。そのため、該画分を抗原として得られた抗体 (抗血清) は、モルモット I g E に対する特異性が低く、そこから抗モルモット I g E 抗体を得るためには、抗血清を正常モルモット血清によって中和する必要があった。また、非特許文献 2 及び 3 にも非特許文献 1 と同様な画分及び抗体が記載されている。

【0005】

非特許文献 4 には、モルモット血液中の免疫グロブリン画分から、免疫グロブリンの各クラスを分離する方法が開示されている。そして、その図 8 にはクロマトグラフィーにより分離された各フラクションの SDS-PAGE (ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法) による結果が示されているが、PCA 反応の活性を指標として I g E が含まれるとするフラクション 3 及び 4 の結果には、他のフラクションと区別できる固有の主バンドが形成されていない。これは、前記 2 つのフラクションには、その存在が SDS-PAGE では捉えられない極微量の I g E しか含まれていないためであると考えられる。

【0006】

仮にこのようなフラクションを抗原として使用したとしても特異性の高い抗モルモット I g E 抗体を製造することはできない。

【0007】

以上のとおり、これまで特異性に優れた抗モルモット I g E 抗体及び該抗体を製造するための純度の高い抗原、すなわち、高純度のモルモット I g E はこれまで製造されていなかったし、その性状も知られていなかった。

【非特許文献 1】“Int. Archs Allergy appl. Immun.”、1985 年、第 77 巻、p. 438-444

【非特許文献2】“Int Arch Allergy Appl Immunol”、1988年、第87巻、p. 424-429

【非特許文献3】“ANNALS OF ALLERGY”、1981年、第47巻、p. 52-56

【非特許文献4】“Journal of Immunological Methods”、1991年、第139巻、p. 123-134

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

前述のように、現在IgEが関与するアレルギーの実験系として、モルモットのPCA反応が実施されている。しかしながら、PCA反応はIgEそれ自体を定量的に測定するものではない。PCA反応においては、IgEと結合した肥満細胞が抗原により刺激され、放出されたケミカルメディエーター（ヒスタミン、ロイコトリエンなど）が血管に作用し、そこから漏出する色素量を測定することによって、アレルギー反応の程度を推測しているに過ぎない。

【0009】

このような状況において、アレルギーの実験現場においては、特異性の高い抗モルモットIgE抗体及び該抗体を含む精度の高いモルモットIgE測定用試薬の開発が望まれていた。

【0010】

本発明は、高度に精製されたモルモットIgEからなる画分、該画分を抗原として使用することによって製造される特異性に優れた抗モルモットIgE抗体及び、高い測定感度を有するとともに正確かつ簡便なモルモットIgEの免疫測定用試薬を提供することを目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、アレルゲン、特に卵白アルブミン（ovalbumin、以下「OVA」ということもある）で感作されたモルモットの血液から分離された免疫グロブリン画分よりIgEからなる画分を精製し、その性状を確認した。そして、この画分を抗原として使用することにより製造された抗モルモットIgE抗体がモルモットIgEを特異的に認識すること、さらには、この抗体を利用してIgEの免疫測定系を組み立てたところ高い感度で正確にモルモットのIgEが測定できることを見だし、本発明を完成した。

【0012】

すなわち本発明は、以下のとおりである。

【0013】

[1] アレルゲンで感作されたモルモットの血液から分離され、SDS-PAGEにより単一の主バンドを得るのに十分な純度をもつ本質的に精製された下記性状を有するモルモット免疫グロブリンEからなる画分；

(1) 前記主バンドの分子量は約200kDaである、

(2) 前記主バンドは還元性SDS-PAGEにより2つに分離され、分離後の各バンドの分子量は約70kDa及び約30kDaである、

(3) モルモット免疫グロブリンEを特異的に認識することができる抗体を製造するための抗原として使用できる、

(4) モルモットにおけるPCA反応が陽性である、

(5) 実質的にモルモット免疫グロブリンGを含有しない。

【0014】

[2] アレルゲンが卵白アルブミンである上記[1]に記載のモルモット免疫グロブリンEからなる画分。

【0015】

[3] 上記[1]又は[2]に記載の免疫グロブリンEからなる画分でもってヒト以外の

動物を免疫して製造されるモルモット免疫グロブリン E を特異的に認識することができる抗体。

【0016】

〔4〕抗体がモノクローナル抗体である上記〔3〕に記載のモルモット免疫グロブリン E を特異的に認識することができる抗体。

【0017】

〔5〕上記〔3〕又は〔4〕に記載の抗体を含むモルモット免疫グロブリン E の免疫測定用試薬。

【0018】

〔6〕上記〔3〕又は〔4〕に記載の抗体及び酵素標識された前記抗体を含むモルモット免疫グロブリン E の免疫測定用試薬。

【0019】

〔7〕免疫測定用試薬がサンドイッチ酵素結合免疫固相測定法を実施するための試薬である上記〔5〕又は〔6〕に記載のモルモット免疫グロブリン E の免疫測定用試薬。

【0020】

〔8〕固相化された上記〔3〕又は〔4〕に記載の抗体及び標識物質により標識された卵白アルブミンを含むモルモット免疫グロブリン E の免疫測定用試薬。

【0021】

〔9〕固相化された卵白アルブミン及び標識物質により標識された上記〔3〕又は〔4〕に記載の抗体を含むモルモット免疫グロブリン E の免疫測定用試薬。

【0022】

〔10〕標識物質が酵素である上記〔8〕又は〔9〕に記載のモルモット免疫グロブリン E の免疫測定用試薬。

【0023】

〔11〕モルモット免疫グロブリン E が卵白アルブミンを認識する免疫グロブリン E である上記〔8〕～〔10〕のいずれかに記載の免疫測定用試薬。

【0024】

上記本発明〔1〕によれば、抗モルモット I g E 抗体を製造するための高度に精製された抗原を提供することができる。上記本発明〔3〕は、特異性に優れた抗モルモット I g E 抗体を提供するものであり、それを含む上記本発明〔5〕によって、血液等の生体試料中のモルモット I g E を高感度で、正確かつ簡便に測定することができる。

【0025】

また、本発明〔8〕によれば、OVA を抗原抗体反応によって認識するモルモット免疫グロブリン E を特異的に測定することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

本発明は、アレルゲンで感作されたモルモット血液から分離され、特定の性状を有するモルモット免疫グロブリン E からなる画分（以下「モルモット I g E 画分」という）に関する。

【0027】

本発明のモルモット I g E 画分は、アレルゲンで感作されたモルモット血液の免疫グロブリン画分から精製されたものである。

【0028】

アレルゲンとしては、そのものでもってモルモットを感作した場合に、その血液中に I g E を過剰に産生せしめるものであれば、特に制限されずこの分野で公知の何れのものも使用することができる。このようなアレルゲンとして例えば、OVA、ダニ抗原、寄生虫、寄生虫抽出蛋白、ウマ血清などが挙げられるが、これらの中でも、入手や取り扱いが容易な点において OVA が好ましい。

【0029】

感作は、常法、例えばアレルゲンをモルモット腹腔内に一定期間にわたって投与するこ

とにより行なうことができる。免疫グロブリン画分は、このようにしてアレルゲンによって感作されたモルモットの血液を採取し、飽和硫酸アンモニウム塩析法などの公知の処理をなすことにより製造することができる。

【0030】

このようにして得られるモルモットの免疫グロブリン画分より、それ自体公知の物理化学的手段を複数組み合わせることによって、本発明のモルモット I g E 画分を製造することができる。

【0031】

例えば、免疫グロブリン画分中に大量に含まれる免疫グロブリン G を除去するためには、プロテイン G カラムや DE 52 陰イオン交換樹脂を利用する方法がとられる。また、モルモット I g E 画分の精製のためには、Q-Sepharose カラムクロマトグラフィーや Mono Q カラムクロマトグラフィーなどの陰イオン交換処理、Superdex 200 カラムクロマトグラフィーなどのゲル濾過カラム処理などが行なわれる。なお、これらの物理化学的手段の各々は、必要に応じて、複数回繰り返し実施してもよい。

【0032】

上記各物理化学的手段においては、各手段に応じて通常使用される溶媒を特別な制限なく、適宜使用することができる。

【0033】

より具体的には、後記実施例に記載されている方法によって本発明のモルモット I g E 画分を製造することができる。

【0034】

かくして得られる本発明のモルモット I g E 画分が前記のような諸性状を有することは、後記実施例に示すとおりである。

【0035】

本発明のモルモット I g E 画分中に含まれる I g E の純度は高い方が、抗原として使用した場合に、より特異性の高い抗 I g E 抗体を得ることができる点において好ましい。

【0036】

また、本発明は、上記モルモット I g E 画分でもってヒト以外の動物を免疫して製造されるモルモット免疫グロブリン E を特異的に認識することができる抗体に関する。

【0037】

本発明の抗体は、モルモットの I g E を特異的に認識する抗体であればポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体の何れでもよいが、特異性及び均一性が高い点においてモノクローナル抗体の方が好ましい。

【0038】

ポリクローナル抗体は、本発明のモルモット I g E 画分を抗原として使用し、ヒト以外の動物を免疫することにより製造することができる。詳細には、前記のようにして得られたモルモット I g E 画分を適当なアジュバントと混合してウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ニワトリなどのヒト以外の動物に免疫し、血液を採取して公知の処理をなすことによって製造することができる。またモノクローナル抗体は、このように免疫された動物の脾臓細胞を採取し、ミルシュタインらの方法によりミエローマ細胞との細胞融合、抗体産生細胞スクリーニング及びクローニング等を行い、抗モルモット I g E 抗体を産生する細胞株を樹立し、これを培養することにより製造することができる。

【0039】

このようにして得られた抗モルモット I g E 抗体は、モルモットの I g E に対する特異性が極めて高く、他のクラスの免疫グロブリン、例えば、通常血液中において I g E よりもはるかに大量に存在するとされている免疫グロブリン G を認識しないものである。

【0040】

本発明の抗 I g E 抗体は、後述する本発明の免疫測定用試薬において好適に使用することができる。

【0041】

さらに本発明は、上記抗モルモット I g E 抗体を含むモルモット I g E の免疫測定用試薬に関する。

【0042】

本発明のモルモット I g E の免疫測定用試薬は、本発明の抗モルモット I g E 抗体の抗原に対する高い特異性に基づくものであり、種々の免疫測定法を実施するための試薬として有用である。ここにおける免疫測定法としては、抗原・抗体反応を含む測定法であればいずれでもよく、例えば、酵素免疫測定法（E I A 法）、ラテックス凝集法、イムノクロマト法、放射免疫測定法（R I A 法）、蛍光免疫測定法（F I A 法）、ルミネッセンス免疫測定法、エバネッセンス波分析法などが挙げられる。これらの中でも、E I A 法やラテックス凝集法を実施するための本発明の試薬が操作の容易性の観点からして好適である。

【0043】

本発明の免疫測定用試薬として E I A 法を実施するための試薬を選択した場合、E I A 法がモルモット I g E に存在する異なるエピトープを認識する 2 種類の抗モルモット I g E 抗体を用いたサンドイッチ酵素結合免疫固相測定法（サンドイッチ E L I S A 法）であるのが好ましい。

【0044】

また、サンドイッチ E L I S A 法の一つとしてアビジン-ビオチン反応を利用した方法もある。本法は、試料中のモルモット I g E を固相化抗モルモット I g E 抗体でもって捕捉し、捕捉されたモルモット I g E とビオチンで標識した抗体との間で抗原抗体反応を行わせ、次に、酵素標識ストレプトアビジンを加えて、アビジン-ビオチン反応を行わせることを測定原理としている。

【0045】

このようなサンドイッチ E L I S A 法は、2 種類の抗体を用いることから抗原に対する特異性が優れており、他のクラスの免疫グロブリンが混在する試料中のモルモット I g E を正確に測定することができる。

【0046】

本発明のサンドイッチ E L I S A 法を実施するための試薬は、固相化抗モルモット I g E 抗体及び酵素またはビオチン標識抗モルモット I g E 抗体から構成される。

【0047】

サンドイッチ E L I S A 法を実施するための試薬に含まれる 2 種類の抗モルモット I g E 抗体は、モノクローナル抗体同士、ポリクローナル抗体同士又はモノクローナル抗体とポリクローナル抗体の組合せの何れでも良い。

【0048】

固相化抗モルモット I g E 抗体は、前述のようにして得られた抗体を、例えば、マイクロプレートウェルやプラスチックビーズなどの固相に結合させることにより製造することができる。固相への結合は通常、抗体をクエン酸緩衝液等の適当な緩衝液に溶解し、固相表面と抗体溶液を適当な時間（1～2日）接触させることにより行なうことができる。

【0049】

さらに、非特異的吸着や非特異的反応を抑制するために牛血清アルブミン（B S A）や牛ミルク蛋白等のリン酸緩衝溶液を固相と接触させ、抗体によってコートされなかった固相表面部分を前記 B S A や牛ミルク蛋白等でブロッキングすることが一般に行なわれる。

【0050】

酵素標識抗モルモット I g E 抗体は、上記固相化した抗体とは異なるエピトープを認識する抗モルモット I g E 抗体と酵素とを結合（標識）させることにより製造することができる。該抗体を標識する酵素としては、パーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼなどが挙げられる。これらの酵素と抗モルモット I g E 抗体との結合はそれ自体公知の方法、例えば、グルタルアルデヒド法、マレイミド法などにより行なうことができる。

【0051】

また、ビオチン標識抗モルモット I g E 抗体はビオチンと抗モルモット I g E 抗体とを

周知の方法により結合させることにより製造することができる。例えば、市販のビオチン標識化キットを使用して、ビオチンと抗モルモット IgE 抗体とを結合させることができる。

【0052】

サンドイッチ ELISA 法を実施するための本発明の試薬には上記抗モルモット IgE 抗体以外に必要に応じて、標準物質、洗浄液、酵素活性測定用試薬（基質剤、基質溶解液、反応停止液等）などを構成試薬として含んでいてもよい。また、アビジン-ビオチン反応を利用した方法を実施するための本発明の試薬には、さらに酵素標識ストレプトアビジンを含んでいてもよい。

【0053】

所望により試薬に含まれる基質剤としては、選択した標識酵素に応じて適当なものが選ばれる。例えば、酵素としてパーオキシダーゼを選択した場合においては、 o -フェニレンジアミン（OPD）、テトラメチルベンチジン（TMB）などが使用され、アルカリホスファターゼを選択した場合においては、 p -ニトロフェニルホスフェート（PNPP）などが使用される。また、反応停止液、基質溶解液についても、選択した酵素に応じて、従来公知のものを特に制限なく適宜使用することができる。

【0054】

本発明の別の好ましい形態である、ラテックス凝集法を実施するための試薬には、抗モルモット IgE 抗体はラテックス感作抗モルモット IgE 抗体の形で含まれる。ラテックス粒子と抗体との感作（結合）は、この分野で公知の方法、例えば、架橋剤としてカルボジイミドやグルタルアルデヒド等を利用する化学結合法や物理吸着法により成すことができる。

【0055】

ラテックス凝集法を実施するための試薬には、上記ラテックス感作抗モルモット免疫グロブリン抗体以外に、必要に応じて、希釈安定化緩衝液、標準物質などを含んでいてもよい。

【0056】

なお、本発明の別の実施形態である放射免疫測定法（RIA 法）、蛍光免疫測定法（FIA 法）、ルミネッセンス免疫測定法などを実施するための試薬も上記 EIA 法やラテックス凝集法を実施するための試薬に準じて常法に従い製造することができる。

【0057】

以上のようにして製造された、本発明のモルモット IgE の免疫測定用試薬は、免疫グロブリン E のみを特異的に測定できるものであり、他のクラスの免疫グロブリン、例えば、後記実施例に示すように免疫グロブリン G、免疫グロブリン M とは交差しない。

【0058】

また本発明は、固相化された前記抗モルモット IgE 抗体及び標識物質により標識された OVA を含むモルモット免疫グロブリン E の免疫測定用試薬に関する。

【0059】

固相化された前記抗モルモット IgE 抗体は、上記サンドイッチ ELISA の場合と同様にして製造することができる。

【0060】

OVA を標識する標識物質としては、酵素、蛍光物質、放射性物質等が挙げられる。酵素の具体例としては、パーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼなどが挙げられる。また、蛍光物質としては、例えば、フルオレッセン又はその誘導体が挙げられ、放射性物質としては、例えば、 ^{125}I が挙げられる。このような標識物質のうち、取扱いが容易である点において酵素が好ましい。

【0061】

標識された OVA は、公知のグルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法またはマレイミド法などの方法により、OVA と標識物質とを結合せしめることによって製造することができる。例えば、酵素標識 OVA の具体的な製造方法は後記実施例に示すとおりである。

【0062】

このようにして製造された、固相化抗モルモット IgE 抗体及び標識OVAを含む本発明の免疫測定用試薬は、OVAを認識するモルモット IgE の濃度を特異的に測定するものである。その測定の機構は以下のとおりである。

【0063】

マイクロプレート等に固相化された本発明の抗モルモット IgE 抗体に検体中の IgE が捕捉され、そこに標識物質で標識されたOVAが添加されると、標識OVAは捕捉されたIgEの中、OVAを認識するIgEのみに結合し、その標識物質の量を公知の方法により測定することによって、OVAを認識するモルモット IgE を特異的に測定することができる。

【0064】

上記の機構において、固相化抗体に代えて固相化OVAを使用し、標識OVAに代えて標識抗体を使用することによっても、OVAを認識するモルモット IgE を測定することができる。従って、本発明の試薬は、固相化されたOVA及び標識物で標識された前記抗モルモット IgE 抗体を含むモルモット IgE の免疫測定用試薬の形態で実現されてもよい。

【0065】

なお、OVAの固相化は、前述の抗モルモット IgE 抗体の場合と同様にして行うことができる。

【0066】

このようなモルモット IgE の免疫測定用試薬には、前述のサンドイッチELISA法による試薬と同様に、必要に応じて標準物質、洗浄液などを構成試薬として含んでも良い。標識物質が酵素の場合には、さらに基質剤、基質溶解液、反応停止液などの酵素活性測定用試薬を構成試薬として含んでも良い。

【実施例】

【0067】

以下に、実施例を挙げて本発明を詳細に説明する。

【0068】

実施例1；モルモット IgE 画分の製造

(1) アレルゲンの感作

10 μ gのOVAと4mLの水酸化アルミニウムゲルを混和し、モルモット(Hartley系、約600g、雌)の腹腔内に投与した。その後直ちに、百日咳ワクチン(2.5 $\times 10^{10}$ 菌体/個体)を同様にして腹腔内に投与した(初回感作)。12日後に250mg/kgの用量でシクロフォスファミドを腹腔内投与(生理食塩水4mL)した。その後、初回感作と同様な方法で2週間間隔で8回感作した。感作が完了した後、ジエチルエーテル麻醉下で開胸し、心臓より採血した。血液を遠心分離(3000rpm, 10min, 4 $^{\circ}$ C)し、血清35mLを回収した。

【0069】

(2) 免疫グロブリン画分の分離

上記(1)により得られた血清を遠心分離(18,000rpm \times 15min)し、上清に等量の20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)を加えた。この混合液と等量の飽和硫酸溶液を氷冷下にて攪拌しながら滴々添加し(50%飽和硫酸)、添加後20分間攪拌した。次に遠心分離し(18,000rpm \times 30min)、得られた沈殿を10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)に溶解し、10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)に対して透析し、免疫グロブリン画分液を得た。

【0070】

(3) モルモット IgE 画分の精製

上記(2)において得られた免疫グロブリン画分液を遠心分離し(18,000rpm \times 30min)内容液中の混濁物を除去後、陰イオン交換樹脂(DE52)を100mL充填し、10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)で平衡化したカラムに展開した。10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)でカラムを洗浄後、次に35mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)でIgEを溶出さ

せた。DE52のIgE溶出画分液を50%飽和硫酸とし20分間攪拌後、遠心分離した(18,000rpm×30min)。得られた沈殿を20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)で溶解し、同様の緩衝液にて透析を行い、IgE含有溶液を得た。硫酸精製後のIgE含有溶液を20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)で平衡化したProtein G カラム(Protein G Sepharose 4 Fast Flow [商品名]、カラムサイズ; 1. 6×3 cm、アマシャムバイオサイエンス社)に展開した(流速0. 5 mL/分)。同緩衝液での素通り画分を分取した。再度Protein G カラムへ同条件にて展開し、素通り画分を回収し、10mM Na,K リン酸緩衝液pH7.5に対して透析した。

【0071】

Protein G処理後の透析内液をQ-Sepharose F.F. column (Q-Sepharose Fast Flow[商品名]、カラムサイズ; 1. 6×8. 5 cm、アマシャムバイオサイエンス社)に展開した(Buffer A=10mM Na,K リン酸緩衝液pH7.5, Buffer B=0.3M Na,K リン酸緩衝液pH7.5, Flow=3mL/min, Fraction size=3mL, Gradient=0%B for 5min. 0-100%B in 90min)。後述するPCA反応試験によりIgE溶出画分を決定した。

【0072】

Q-Sepharose IgE溶出画分液を限外ろ過にて濃縮し、Superdex 200 column (Superdex 200 XK16/60 [商品名]、カラムサイズ; 1. 6×60 cm、アマシャムバイオサイエンス社)に展開した(流速; 1 mL/分、フラクションサイズ; 1 mL、溶出液; 50 mmol/L MES, 0.1mol/L NaCl, pH6.5)。PCA反応試験によりIgE溶出画分を決定し、10mM Na,K リン酸緩衝液 pH7.5に対して透析した。

【0073】

Superdex 200 columnのIgE溶出画分をMono Q column (Mono Q HR5/5[商品名]、カラムサイズ; 0. 5×5 cm、アマシャムバイオサイエンス社)に展開した(Starting buffer (buffer A): 0.01M Na,K phosphate buffer pH7.5, Gradient buffer (buffer B): 0.3 M Na,K phosphate buffer pH7.5, Gradient: sample チャージ後、0%B for 5min, 0-100% B in 30min、流速1.0ml/min、UV range 0-0.2)。後述するPCA反応試験によりIgE溶出画分を決定し、モルモット I g E画分を得た。

【0074】

(4) モルモット I g E画分の諸性状

上記(3)で得られたモルモット I g E画分の諸性状は以下のとおりであった。

【0075】

[1] SDS-PAGEにより単一の主バンドが得られ、その主バンドの分子量は約200 kDaである;

モルモット I g E画分を非還元性試料用緩衝液(62.5 mmol/L Tris-HCl pH6.8、25%グリセロール、2% SDS及び0.01%ブロムフェノールブルー)に溶解し、100℃で3分間加熱後、SDS-PAGEを行った。アクリルアミド濃度が5~20%濃度勾配のゲル(E-T520L型、アトー社)で試料を分離した。電気泳動緩衝液として、62.5 mmol/L Tris-HCl pH8.3、192mmol/Lグリシン、0.1% SDSを使用した。40mAで80分間電気泳動した後、ゲルを銀染色(銀染色キットワコー、和光純薬工業)した。分子量マーカーとして、HMW SDS マーカーキット(ミオシン[212,000Da]、 α_2 マクログロブリン[170,000Da]、 β ガラクトシダーゼ[116,000Da]、トランスフェリン[76,000Da]、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ[53,000Da]、アマシャムバイオサイエンス社)を使用した。

【0076】

図1に示すように、分子量約200 kDaのところに、単一の主バンドが認められた(レーン1; マーカー、レーン2; モルモット I g E画分)。

【0077】

[2]前記主バンドは還元性SDS-PAGEにより2つに分離され、分離後の各バンドの分子量は約70 kDa及び約30 kDaである;

モルモット I g E画分を還元性試料用緩衝液(62.5 mmol/L Tris-HCl pH6.8、350 mmol/L ジチオスレイトール、25%グリセロール、2% SDS及び0.01%ブロムフェノールブルー

)に溶解し、100℃で3分間加熱後、SDS-PAGEを行った。アクリルアミド濃度が5~20%濃度勾配のゲル(E-T520L型、アトー社)で試料を分離した。電気泳動緩衝液として、62.5 mmol/L Tris-HCl pH8.3、192mmol/Lグリシン、0.1% SDSを用いた。40mAで80分間電気泳動した後、上記と同様にしてゲルを銀染色した。分子量マーカーとして、LMW マーカーキット(ホスフォリラーゼ b [97,000Da]、アルブミン [66,000Da]、卵白アルブミン [43,000Da]、カルボニックアンヒドラーゼ [30,000Da]、トリプシンインヒビター[20,100Da]、 α -ラクトアルブミン [14,400Da]、アマシヤムバイオサイエンス社)を使用した。

【0078】

図2に示すように、モルモット IgE 画分の還元性 SDS-PAGE により、上記[1]において認められた約 200 kDa の主バンドは認められず、約 70 kDa と約 30 kDa のバンドが認められた(レーン1; マーカー、レーン2; モルモット IgE 画分)。

【0079】

[3]モルモット IgE を特異的に認識することができる抗体を製造するための抗原として使用できる;

この性状については、後記実施例2に記載されているとおりである。

【0080】

[4]モルモットにおける PCA 反応が陽性である;

モルモット IgE 画分を生理食塩水を用いて、蛋白濃度が31.3、62.5、125および250ng/mLとなるように希釈系列を調製した。モルモット(Hartley、雌、450~600g)をエーテル麻酔し、背皮毛を刈り、皮膚に調製したモルモット IgE 画分を0.1mLずつ皮内注射した。8日間飼育後、前肢より、1mg/mL OVA 及び1%エバンスブルーの生理食塩水液を1mL注入し、30分放置した。図3に示すように、屠殺後の皮膚裏側にはモルモット IgE 画分の蛋白濃度依存的に青斑が認められた。

【0081】

[5]実質的にモルモット免疫グロブリン G を含有しない;

モルモット IgE 画分を精製する過程における Protein G カラムクロマトグラフィーにて、カラムに吸着した IgG を溶出し、モルモット IgG 画分とした。モルモット IgG 画分とモルモット IgE 画分を上記非還元性条件にて SDS-PAGE を行った(図4参照。レーン1; マーカー、レーン2; モルモット IgG 画分、レーン3; モルモット IgE 画分)。

【0082】

ホライズプロット(アトー社)にてゲル中の分離された蛋白をニトロセルロース膜に転写した(131mAで1時間)。転写後のニトロセルロース膜をブロッキング溶液(2%ブロックエース[登録商標]粉末)中で室温にて30分間振盪した後、洗浄液(20mmol/L Tris, 500mmol/L NaCl, 0.05% Tween[登録商標]-20, pH7.5)中で室温にて10分間振盪した。ヤギ抗モルモット IgG 抗体(ケミコン社)をブロッキング溶液にて最終抗体濃度が10 μ g/mLとなるように希釈した。洗浄後のニトロセルロース膜を10 μ g/mLに希釈したヤギ抗モルモット IgG 抗体で室温にて1時間振盪した。ニトロセルロース膜を洗浄液中で室温にて5分間振盪し、洗浄液を除去後、洗浄液を加えて再度室温にて5分間振盪した。洗浄後のニトロセルロース膜を、ブロッキング溶液にてホースラディッシュスーパーオキシダーゼ標識ブタ抗ヤギ IgG 抗体(大日本製薬)を2000倍希釈した溶液中で室温にて1時間振盪した。洗浄液中で室温にて5分間の振盪を2回繰り返し、20mmol/L Tris, 500mmol/L NaCl, pH7.5中で室温にて5分間振盪した。ニトロセルロース膜を Immun-blot assay kit(Bio-Rad社)の試薬である Developer と室温にて5分間振盪し、発色反応を行い、蒸留水で洗浄し、反応を停止させた。

【0083】

図4に示すようにモルモット IgG 画分試料では分子量約160kDa付近にモルモット IgG に関与する強い発色が認められた(レーン4; モルモット IgG 画分)。一方、モルモット IgE 画分試料では分子量約160kDa付近には発色が認められなかった(レーン5; モルモット IgE 画分)。これらのことより、本発明のモルモット IgE 画分が実質的にモルモット

IgGを含有しないことが示された。

【0084】

実施例 2；抗モルモット IgE 抗体の製造

実施例 1 で得られた画分とアジュバント (Titer Max: シグマ社製) を等量混合後、超音波処理により乳化させ、実施例 1 で得られた画分 $25\mu\text{g}$ /エマルジョン 0.5mL /マウスとなるよう調製した。この免疫抗原をマウス (BALB/c、4週齢) に2週間間隔で3回皮内及び皮下に投与した。3回目の免疫から1週間後に、マウスより脾臓細胞を取り出し、マウスミエローマ細胞と PEG 法にて細胞融合した。融合後、ハイブリドーマを 96 ウェルプレートに分注し、 37°C の炭酸ガス培養器 ($5\% \text{CO}_2$, 37°C) 中で 1-2 週間培養し、HAT 培地による選択を行った。モルモット IgE 画分を固相化したマイクロプレートを用いて、融合細胞の上清を ELISA 法により検出し、抗体の有無を確認した。陽性となったウェルに対しては、限界希釈法によるクローニングを 2 回繰り返し、モルモット IgE に対する反応性を有するクローンを選出した。得られたクローンの産生するモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞を BALB/c マウスの腹腔内で増殖させた後、その腹水中からプロテイン G セファロースゲルを用いて精製した。

【0085】

実施例 3；サンドイッチ ELISA 試薬の製造

サンドイッチ ELISA 法によるモルモット IgE の測定用試薬を以下のように製造した。

(1) 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識マウス抗モルモット IgE モノクローナル抗体の調製

西洋ワサビペルオキシダーゼ 4mg を蒸留水 1mL に溶解し、その $600\mu\text{L}$ に 0.1mol/L 過ヨウ素酸ナトリウム溶液 $120\mu\text{L}$ を加えて、室温で 20 分間反応させた。この溶液を 1mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 ($\text{pH} 4.4$) に対して一夜透析し、過ヨウ素酸酸化ペルオキシダーゼ溶液を得た。過ヨウ素酸酸化ペルオキシダーゼ溶液 $300\mu\text{L}$ に、 0.2mol/L 炭酸緩衝液を $15\mu\text{L}$ 加えて、実施例 2 において製造したマウス抗モルモット IgE モノクローナル抗体 (2mg/mL) を混合し、常温、遮光下で 2 時間インキュベーションした。その後、 4mg/mL 水素化ホウ素ナトリウムを $25\mu\text{L}$ 加え、 4°C で 2 時間放置した。 50mmol/L リン酸緩衝液 ($\text{pH} 7.0$) に一晚透析した。

【0086】

(2) マウス抗モルモット IgE 抗体の担体へのコーティング

実施例 2 において得られたマウス抗モルモット IgE 抗体を抗体液用緩衝液 (5mmol/L リン酸塩、 $0.9\% \text{NaCl}$ $\text{pH} 7.0$) に $10\mu\text{g/mL}$ となるように溶解した。これをマイクロタイタープレート (マイクロモジュールプレート、Maxsorp-F8、Nunc 社) に $200\mu\text{L}$ ずつ分注し、 4°C で 3 晩放置した。

【0087】

(3) マイクロタイタープレートのブロッキング

各ウェルを $300\mu\text{L}$ のプレート洗浄液 (40mmol/L リン酸塩、 $0.9\% \text{NaCl}$ 、 0.1% 防腐剤 [プロクリン 150; ローム・アンド・ハース社] 0.1% ウシ血清アルブミン $\text{pH} 7.0$) で 3 回洗浄後、保存用緩衝液 (0.1% プロクリン 150、 1% ブロックエース [登録商標] 粉末; 大日本製薬) $300\mu\text{L}$ を加え室温で 2 時間放置し、その後保存用緩衝液を除去した。

【0088】

(4) 標準物質の調製

前記と同様にして非還元性条件にて、モルモット IgE 画分の SDS-PAGE を行い、ゲルをクマシーブリリアントブルー染色した。染色したゲルをデンシトメーター (島津二波長フライングスポットスキヤニングデンシトメータ CS-9300PC) で計測した。約 200kDa のモルモット IgE 主バンドの染色強度の割合を求めた結果、 79% であった。本画分を BCA protein assay kit (Pierce 社) で蛋白定量し、その蛋白濃度に 0.79 を乗じた値を本画分中のモルモット IgE 濃度とした。本画分をウシ胎児血清で希釈し、 $0, 25, 50, 100, 200, 400, 800\text{ng/mL}$ の標準溶液を調製した。

【0089】

実施例4；実施例3で製造した試薬によるモルモットIgEの測定

(1) 標準曲線の作成

マイクロタイタープレートの各ウェルに反应用緩衝液 (20 mmol/L 2-モルホリノエタンスルホン酸-NaOH, 0.9% NaCl, 0.1% BSA, 0.2% プロクリン150) を100 μ L分注した。ここに、標準物質 (0, 50, 100, 200, 400, 800 ng/mL) を同様に各ウェルに25 μ L加え、室温で1時間放置した。また、各ウェルを洗浄液300 μ Lで3回洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識マウス抗モルモットIgEモノクローナル抗体を希釈液で希釈し、100 μ Lずつ加え、室温で1時間放置した。次に、各ウェルを洗浄液300 μ Lで3回洗浄後、TMB溶液を100 μ Lずつ加え、室温遮光下で30分間反応させた。その後、3.2 mol/L硫酸を100 μ Lずつ加え反応を停止させた。各ウェルの吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて主波長450 nm、副波長630 nmで測定した。図5に標準モルモットIgE (800 ng/mL) の希釈系列試料の測定結果を示した。この図は良好な標準曲線が得られたことを示している。

【0090】

(2) 試薬の基礎性能試験

(ア) 希釈試験

上記(1)の方法に従ってモルモット血清検体の希釈試験を行った。血清はIgE量の不明な血清3検体を検体希釈液でそれぞれ希釈系列を調製し、同時に測定した標準モルモットIgEから得られた標準曲線に基づいて、検体のIgE濃度を算出した。図6の結果に示すとおり、ほぼ原点を通る良好な希釈直線性が得られた。

(イ) 添加回収試験

上記(1)の方法に従ってモルモットIgEの添加回収試験を行った。血清検体3検体に標準モルモットIgEを添加し、測定値から添加したIgE量の回収率を求めた。下記[表1]に示すとおり、添加回収率は98.9%から109.7%と良好な結果が得られた。

【0091】

【表1】

検体	添加濃度 (ng/mL)	測定濃度 (ng/mL)	理論濃度 (ng/mL)	回収量 (ng/mL)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
A	0	74.7	74.7	—	—	98.9
	178.7	249.0	253.4	174.3	97.5	
	342.5	417.9	417.2	343.2	100.2	
B	0	82.6	82.6	—	—	109.7
	178.7	278.8	261.3	196.2	109.8	
	342.5	458.1	425.1	375.5	109.6	
C	0	66.1	66.1	—	—	99.1
	178.7	233.2	244.8	167.1	93.5	
	342.5	424.4	408.6	358.3	104.6	

【0092】

(ウ) 同時再現性試験

上記(1)の方法に従って、同一のモルモット血清サンプルを8回測定して、同時再現性試験を実施した。その間の変動係数CV%は1.8%以下という良好な成績であった。

(エ) 交差反応性試験

上記(1)の方法に従って、精製モルモットIgGおよび精製モルモットIgM (Cortex社) を試料として測定した結果、下記[表2]に示すように、IgG及びIgMとはほとんど交差しなかった。よって、本測定系はモルモットIgGおよびモルモットIgMには交差反応しない測定系であり、モルモットIgEに特異的な測定系であることが示された。

【0093】

【表 2】

モルモット イムノグロブリン	試料濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	測定値 (ng/mL)	交差反応率 (%)
IgE	0.8	800	100
IgG	1429	1.2	0.00008
IgM	900	0.3	0.00003

【0094】

これらの基礎性能試験の結果は、本発明の免疫測定試薬は非常に高い精度でモルモット IgE を測定することができることを示すものである。

【0095】

また、本発明の免疫測定用試薬は、わずか $25\mu\text{L}$ のモルモット血清中に存在する 6.2 ng/mL のモルモット IgE が検出可能であり、非常に感度が高いものであった。なお、本発明の免疫測定用試薬で正常モルモットの血液中 IgE 濃度を測定したところ、 $31.9 \sim 97.6\text{ ng/mL}$ であった。

【0096】

実施例 5；OVA を認識するモルモット IgE の測定

(1) OVA を認識するモルモット IgE 標準物質の調製

実施例 3 で調製したモルモット IgE 標準物質を OVA 固相化カラムに展開して、OVA を認識するモルモット IgE だけを吸着させた。カラムを通過したモルモット IgE を実施例 4 に記載の方法で定量し、カラムに展開したモルモット IgE 量から差し引くことによりカラムに吸着した OVA を認識するモルモット IgE の濃度を求めた。以下、詳細に説明する。

【0097】

(a) OVA 固相化カラムの調製

NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow (アマシャムバイオサイエンス社製) を 5 mL カラムにとり、イソプロパノールを除去した。氷冷した 30 mL の 1 mmol/L HCl で洗浄後、最終濃度が 10 mg/mL OVA となるようにカップリング緩衝液 (0.5 mol/L NaCl, 0.2 mol/L 炭酸ナトリウム[sodium carbonate], $\text{pH} 8.3$) で希釈した溶液を 5 mL 加え、室温で 30 分間静置した。 30 mL のカップリング緩衝液、 30 mL の洗浄緩衝液 (0.5 mol/L NaCl, 0.1 mol/L 酢酸ナトリウム[sodium acetate], $\text{pH} 4.0$)、 30 mL のブロッキング緩衝液 (0.15 mol/L Tris-HCl, $\text{pH} 8.8$) で洗浄し、室温で 1 時間静置した。 30 mL の洗浄緩衝液、 30 mL のブロッキング緩衝液、 30 mL の洗浄緩衝液で洗浄した。OVA を固相化した NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow ゲルを展開緩衝液 (20 mmol/L リン酸ナトリウム[sodium phosphate], $\text{pH} 7.0$) で懸濁し、ゲル容量が 1 mL となるように別のカラムに詰めた。

【0098】

(b) OVA 固相化カラムクロマトグラフィーによる OVA を認識するモルモット IgE 濃度の測定

前項で調製した OVA 固相化 Sepharose 4 Fast Flow カラム (ゲル容量: 1 mL) を前項と同様の展開緩衝液 10 mL で平衡化した。 760 ng/mL のモルモット IgE 標準物質 $100\mu\text{L}$ をカラムに展開し、展開緩衝液でカラムを洗浄した。カラムを通過した分画は、 1 mL ずつ採取した。採取した分画中のモルモット IgE 濃度を実施例 4 に記載の方法で定量した。定量した結果を下記表 3 に示した。カラムを通過した分画中のモルモット IgE の積算量は 19.2 ng であった。カラムに展開したモルモット IgE 量 (76 ng) からカラムを通過したモルモット IgE 量 (19.2 ng) を差し引くことにより、カラムに吸着した OVA を認識するモルモット IgE 量 (56.8 ng) を求めた。これより、上記 OVA 固相化カラムクロマトグラフィーに用いたモルモット IgE 標準物質試料 (760 ng/mL) 中には 568 ng/mL の OVA を認識するモルモット IgE が含有されていることが示された。

【0099】

【表3】

fraction No.	IgE測定値 (ng/mL)	分画(1ml)あたりの IgE量 (ng)
1	8.1	8.1
2	9.3	9.3
3	1.4	1.4
4	0.4	0.4
5	0	0
6	0	0
7	0	0
合計		19.2

【0100】

(2) 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識OVAの調製

(a) OVAのSATA修飾

27mgのOVA (シグマ社製) を1mLの0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) で溶解した。最終濃度が24 mmol/L SATA (N-Succinimidyl S-acetylthioacetate, ピアス社製) となるようにN,N'-dimethylformamideで希釈した溶液を調製し、上記OVA溶液に0.1mL添加し、30℃で30分間インキュベートした後、0.1mLの0.1 mol/L EDTA溶液 (pH7.0)、0.1mLの1 mol/L Tris-HCl (pH7.0)、0.15 mLの1 mol/L ヒドロキシルアミン (hydroxylamine) (pH7.0) を添加し、30℃で15分間インキュベートした。Hi-Trap G-25 (5mL) カラムに展開し (展開緩衝液: 0.1mol/L リン酸ナトリウム pH6.0, 5mmol/L EDTA、流速: 0.5mL/min、分画容量: 0.5mL) で精製後、最終濃度が4mg/mLとなるようにOVA-SATA修飾溶液を調製した。

【0101】

(b) HRP-Sulfo-HMCSの調製

16mgのHRP (東洋紡社製、TYPE I-C) を2.0mLの0.1mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) で溶解した。4mgのSulfo-HMCS (N-(8-Maleimidocapryloxy)sulfosuccinimide, sodium salt 同仁化学研究所社製) を0.275 mLの0.1mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) で溶解した。上記HRP溶液全量に、0.2mLのSulfo-HMCS溶液を加え、30℃で60分間インキュベートした。Hi-Trap G-25 (5mL) カラムに展開し (展開緩衝液: 0.1mol/L リン酸ナトリウム pH6.0, 5mmol/L EDTA、流速: 0.5mL/min、分画容量: 0.5mL) で精製後、最終HRP濃度が7.2mg/mLとなるようにHRP-Sulfo-HMCS溶液を調製した。

【0102】

(c) OVAのHRP標識

OVA-SATA修飾溶液と等量のHRP-Sulfo-HMCS溶液を混合し、4℃で20時間インキュベートした。10mmol/L システアミン塩酸塩 (Cysteamine Hydrochloride) を1mLあたり20μL添加した。Sephacryl S-200 XK-26/70カラム (展開緩衝液: 0.1mol/L リン酸ナトリウム pH6.5、流速: 0.8mL/min、分画容量: 2.0mL) に展開し、ゲルろ過分画した。各分画のHRP活性および、力価測定より回収画分を決定した。

【0103】

(3) 標準曲線の作成

プラスチック製マイクロプレートの各ウェルに150μLの反应用緩衝液 (20 mmol/L 2-メルホリノエタンスルホン酸-NaOH, 0.9%NaCl, 0.1% BSA, 0.2%プロクリン150) を分注し、さらに前項(1)において調製した標準物質の希釈系列 (0, 35.5, 71.0, 141.9, 283.9, 568 ng/mL) を同様に各ウェルに15μL加え、攪拌後室温で10分間放置した。プラスチック製マイクロプレートの各ウェルより110μLずつ試料を取り出し、実施例3に

において調製したマウス抗モルモットIgE抗体をコーティングしたマイクロタイタープレート
の各ウェルに分注し、攪拌後、室温で1時間放置した。各ウェルを洗浄液300 μ Lで3回
洗浄後、上記調製の西洋ワサビペルオキシダーゼ標識OVAを100 μ Lずつ加え、室温で30分
間放置した。次に、各ウェルを洗浄液300 μ Lで3回洗浄後、TMB溶液を100 μ Lずつ加え、室
温遮光下で30分間反応させた。その後、3.2mol/L硫酸を100 μ Lずつ加え反応を停止させた
。各ウェルの吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて主波長450nm、副波長630nmで測
定した。図7に前項(1)において調製したIgE標準物質(568 ng/ml)の希釈系列試料の測
定結果を示した。この図は良好な標準曲線が得られたことを示している。

【0104】

(4) 試薬の基礎性能試験

(ア) 希釈試験

前項(3)の方法に従ってモルモット血清検体の希釈試験を行った。血清はOVAを認識
するIgE量の不明な血清3検体を検体希釈液でそれぞれ希釈系列を調製し、前項(3)と
同様にして得られた標準曲線に基づいて、検体中の、OVAを認識するIgE濃度を算出し
た。図8の結果に示すとおり、ほぼ原点を通る良好な希釈直線性が得られた。

【0105】

(イ) 添加回収試験

前項(3)に記載の方法に従ってOVAを認識するモルモットIgEの添加回収試験を行
った。血清検体5検体に前項(1)と同様にして調製された標準モルモットIgEを添加し
、測定値から添加したIgE量の回収率を求めた。下記[表4]に示すとおり、添加回収率
は97.7%から103.7%と良好な結果が得られた。

【0106】

【表4】

検体	添加濃度 (ng/mL)	測定濃度 (ng/mL)	理論濃度 (ng/mL)	回収量 (ng/mL)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
A	0	86.7	86.7	—	—	100.8
	183.1	278.6	269.8	191.9	104.8	
	384.3	458.6	471.0	371.9	96.8	
B	0	164.6	164.6	—	—	103.7
	183.1	364.6	347.7	200.0	109.2	
	384.3	541.9	548.9	377.3	98.2	
C	0	201.4	201.4	—	—	100.4
	183.1	390.9	384.5	189.5	103.5	
	384.3	575.0	585.7	373.6	97.2	
D	0	456.4	456.4	—	—	97.7
	183.1	642.9	639.5	186.5	101.9	
	384.3	815.9	840.7	359.5	93.5	
E	0	0.6	0.6	—	—	102.0
	183.1	192.9	183.7	192.3	105.0	
	384.3	380.8	384.9	380.2	98.9	

【0107】

(ウ) 同時再現性試験

前項(3)の方法に従って、同一のモルモット血清サンプルを8回測定して、同時再現
性試験を実施した。その間の変動係数CV%は5%以下という良好な成績であった。

【0108】

(エ) 特異性試験

OVAを感作したモルモット(Hartley系)及び無感作のモルモット(同系)よ
り採取した血清検体を試料として、実施例4及び本実施例において使用した測定試薬によ
ってIgE量を測定し、得られた値を比較した。感作は20mgのOVA(シグマ社製)
を0.8mLの生理食塩水に溶解し、モルモットの腹腔内と背側皮下に0.4mLずつ注

入することにより行い、感作から 6 週間後にモルモットから血液を採取した。

【0109】

下記〔表 5〕の測定結果に示すように、無感作モルモット血液中においては、実施例 4 に記載の試薬によって測定した場合には I g E が検出され、本実施例に記載の試薬によって測定した場合 I g E は検出されなかった。これに対し、O V A 感作モルモットにおいては、両試薬で測定した場合ともに I g E が検出され、その濃度は実施例 4 に記載の試薬で測定した場合の方が高かった。この結果は、実施例 4 に記載の試薬は O V A を認識する I g E 及びそれ以外の I g E を測定しており、本実施例に記載の試薬は O V A を認識する I g E を特異的に測定していることを意味している。

【0110】

【表 5】

モルモット 個体番号	感作の 有無	実施例 5 に記載の測定方法 (ng/mL)	実施例 4 に記載の測定方法 (ng/mL)
1	無	0	19.7
2	無	0	26.1
3	無	0	10.9
4	無	0	174.0
5	無	0	46.8
6	有	174.0	438.7
7	有	132.2	579.6
8	有	209.1	666.5
9	有	79.4	428.9
10	有	189.1	1177.8

【0111】

(オ) PCA 反応との相関性試験

血液中に存在する O V A を認識する I g E の指標であるモルモットの PCA 反応と、本実施例の測定系との相関性を次のようにして検討した。18 匹の Hartley 系モルモットを対象とし、その中の 1 匹には O V A 感作を行わずに血液を採取し、常法に従い血清を得た。残りの 17 匹には、腹腔内と背側皮下に 25 mg/mL の O V A 生理食塩水溶液を注入して感作した。感作後、6 週間に至るまで、感作したモルモットを経時的に屠殺して血液を採取し、常法に従い血清を得た。このようにして得られた血清中の I g E 量を本実施例に記載の方法により測定した。

PCA 反応は次のようにして実施した。採取したモルモット血清を生理食塩水にて 10 倍、20 倍、40 倍及び 80 倍に希釈し、希釈系列を調製した。Hartley 系モルモットをエーテル麻酔し、背皮毛を刈り、皮膚に調製した希釈系列試料を 0.1 mL ずつ皮内注射した。7 日間モルモットを飼育後、前肢より 1 mg/mL O V A 及び 1 % エバンズブルーの生理食塩水液を 1 mL 注入し、30 分間放置した。モルモットを屠殺後、背皮を剥いで、青い斑点が認められる最高希釈倍率を PCA 反応値とした。図 9 に示すように、本実施例の測定系と PCA 反応との間には、回帰式 $y = 2.2x + 4.8$ 、相関係数 $r = 0.967$ という非常に良好な相関関係が認められた。このような試験結果は、本実施例のモルモット I g E の免疫測定試薬は、O V A を認識する I g E を特異的に測定できることを示すものである。

【産業上の利用可能性】

【0112】

本発明は、高度に精製されたモルモット I g E 画分、特異性に優れた抗モルモット I g E 抗体、及び該抗体を含むモルモット I g E を正確かつ簡便に測定可能な試薬を提供する。このような本発明により、アレルギーなどの動物実験の現場において、例えば、モルモット血液中の I g E 濃度を感度良く測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 1 1 3 】

【図 1】本発明のモルモット I g E 画分の性状 [1] を表す SDS-PAGE による分析結果である。

【図 2】本発明のモルモット I g E 画分の性状 [2] を表す還元性 SDS-PAGE による分析結果である。

【図 3】本発明のモルモット I g E 画分の性状 [4] を表すモルモット PCA 反応の実験結果である。

【図 4】本発明のモルモット I g E 画分の性状 [5] を表すウェスタンブロッティングの分析結果である。

【図 5】本発明のモルモット I g E の免疫測定用試薬を使用して作成した標準曲線である。

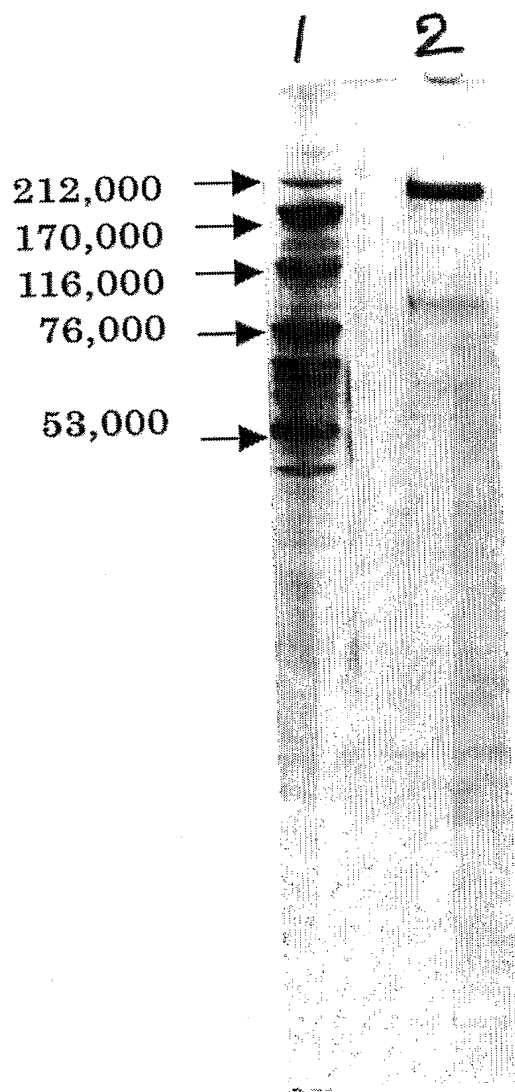
【図 6】本発明のモルモット I g E の免疫測定用試薬の希釈試験（検体 1 ～ 3）の結果である。

【図 7】実施例 5（3）項において作成した標準曲線である。

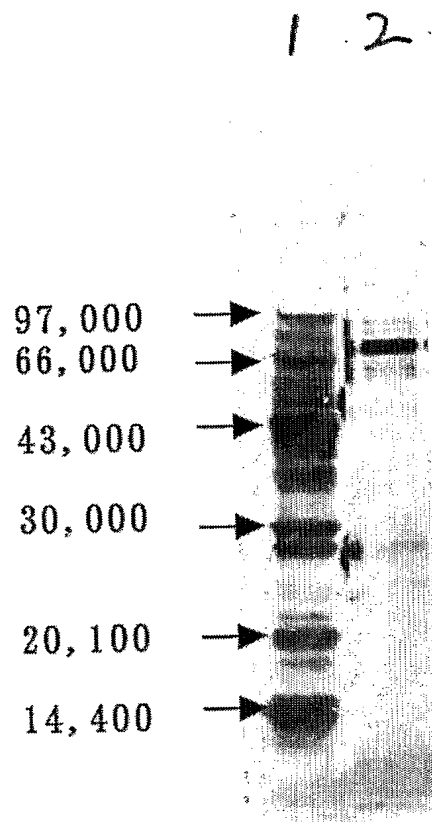
【図 8】実施例 5（4）項の（ア）の希釈試験の結果である。

【図 9】実施例 5（4）項の（オ）の PCA 反応との相関性試験の結果である。

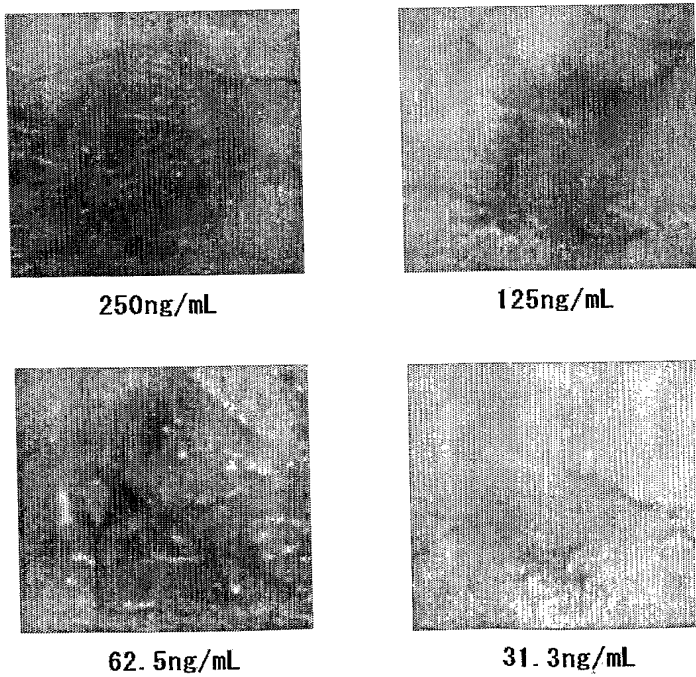
【書類名】 図面
【図 1】



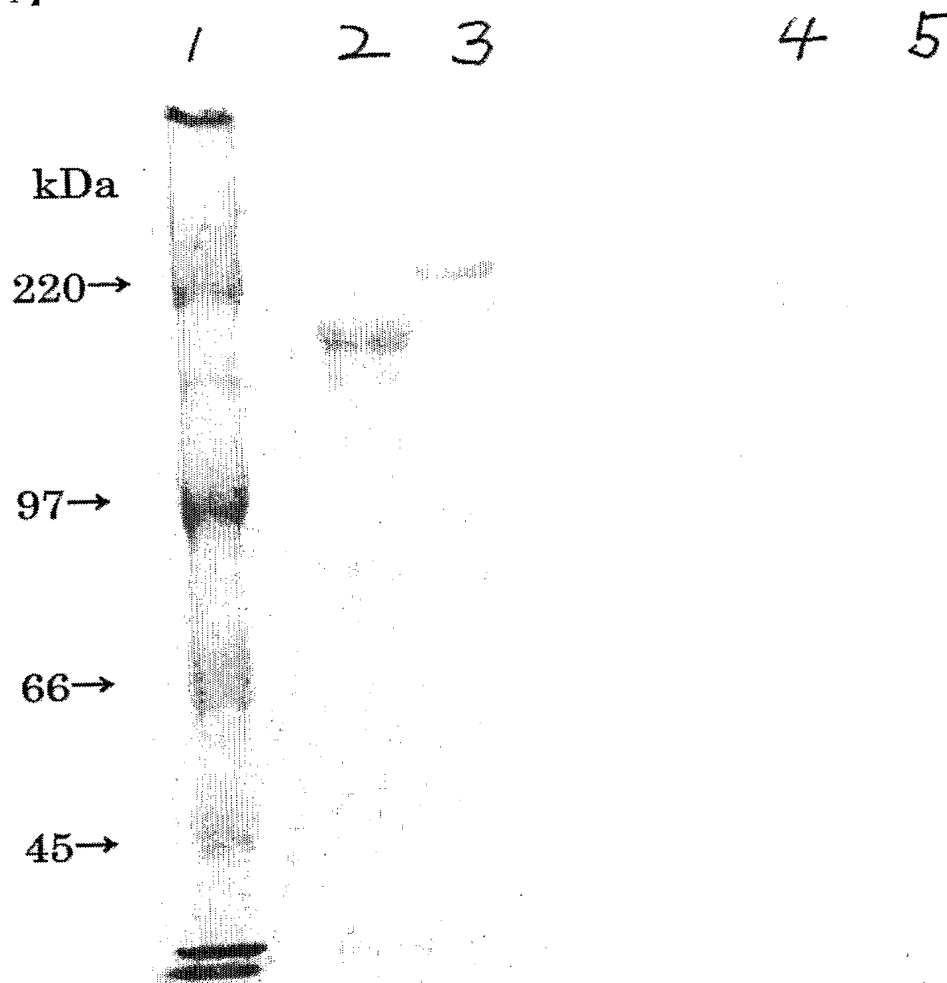
【図 2】



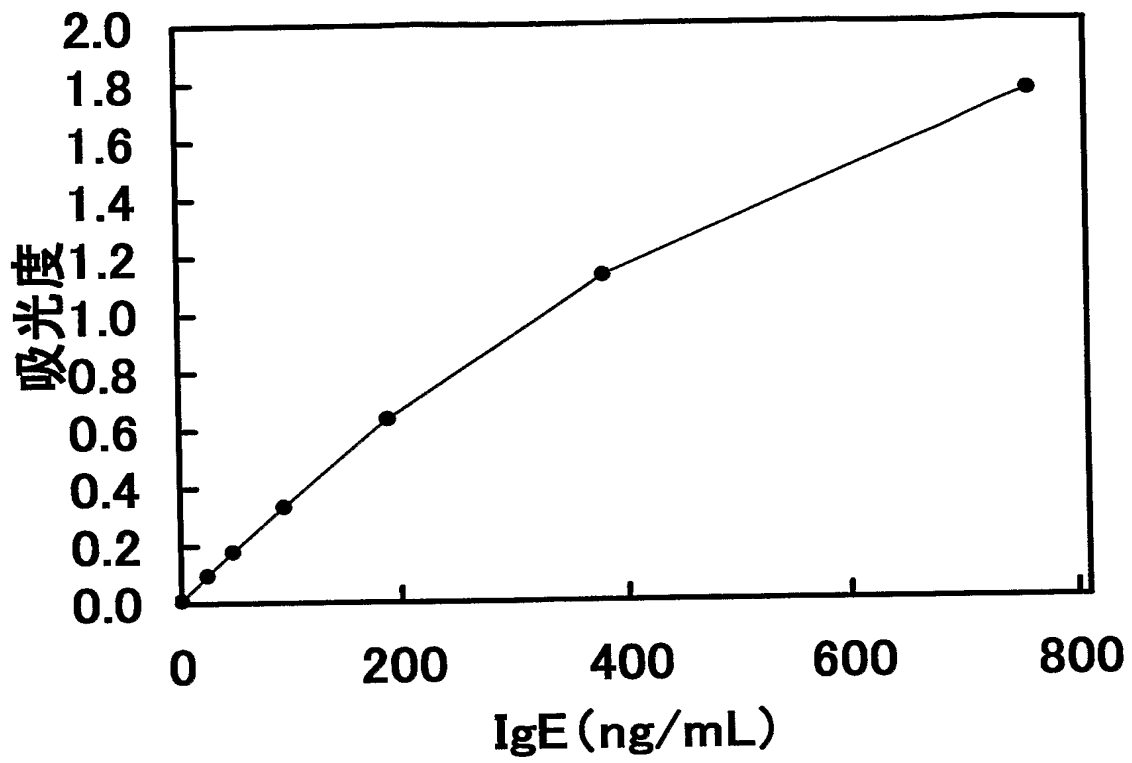
【図 3】



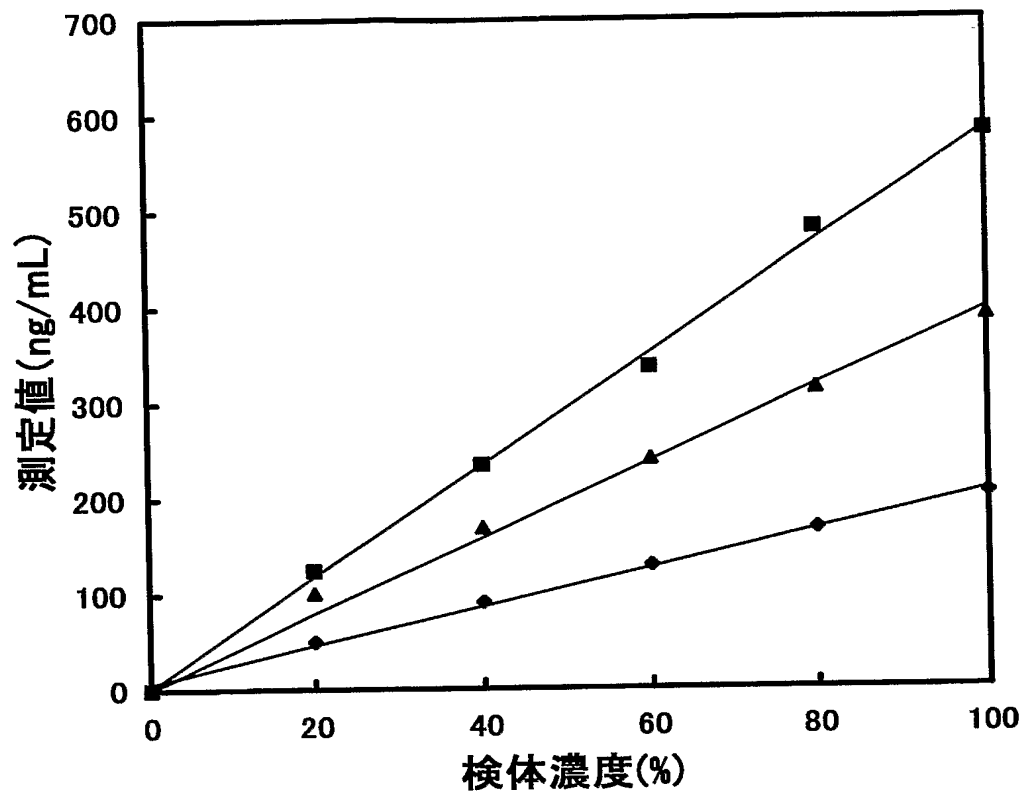
【図 4】



【図 5】

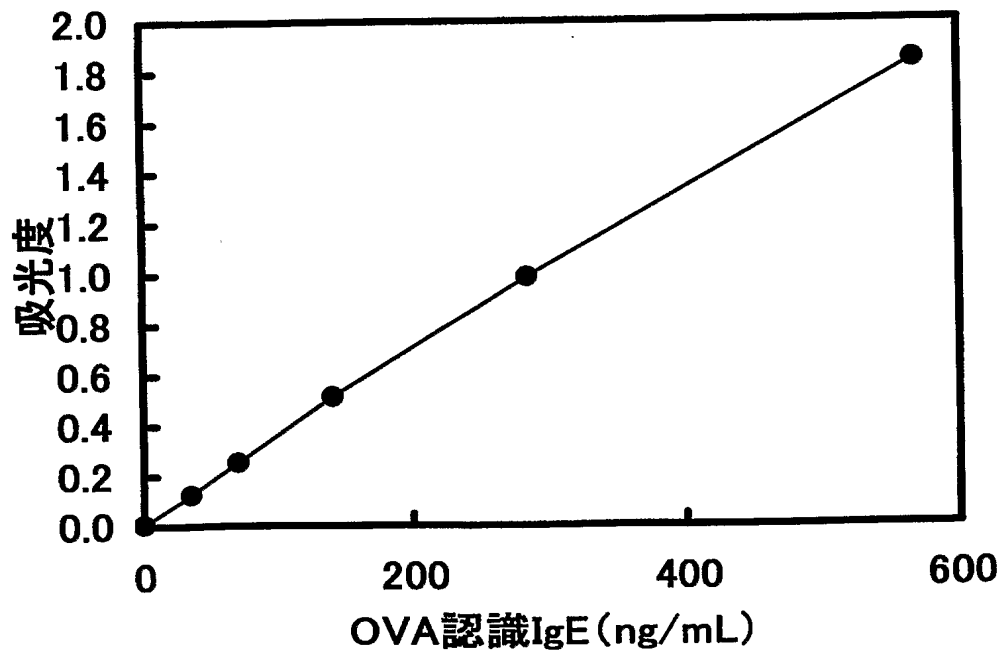


【図 6】

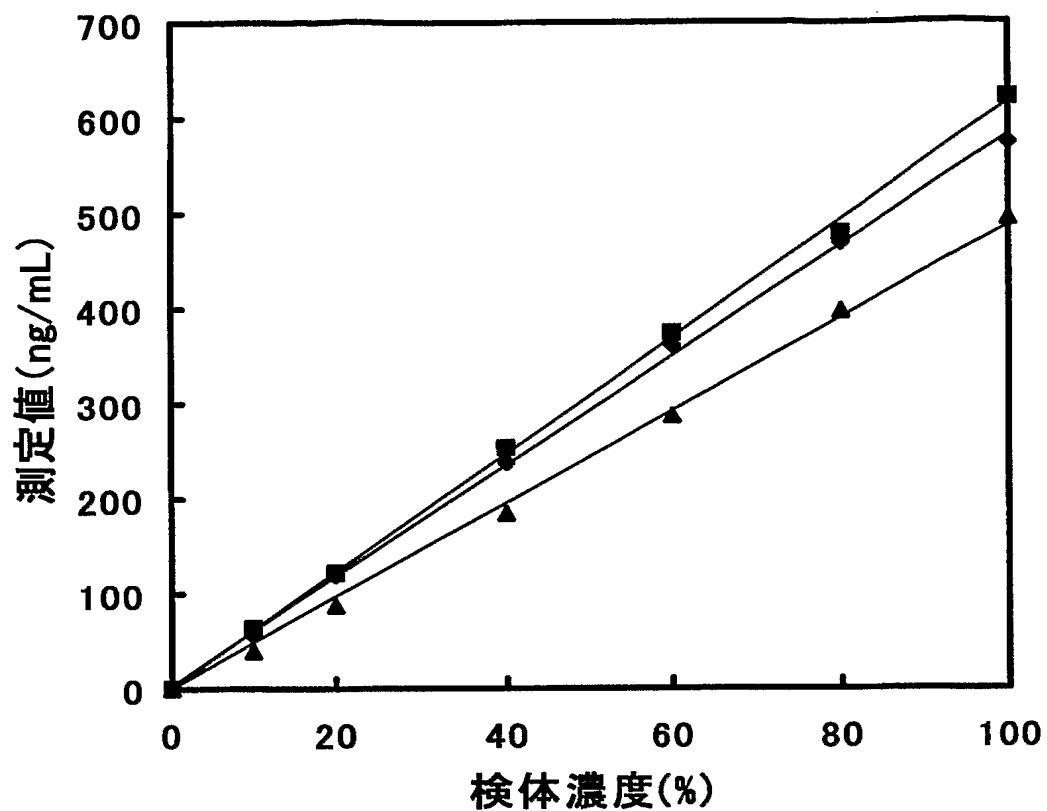


◆ 検体 1 ▲ 検体 2 ■ 検体 3

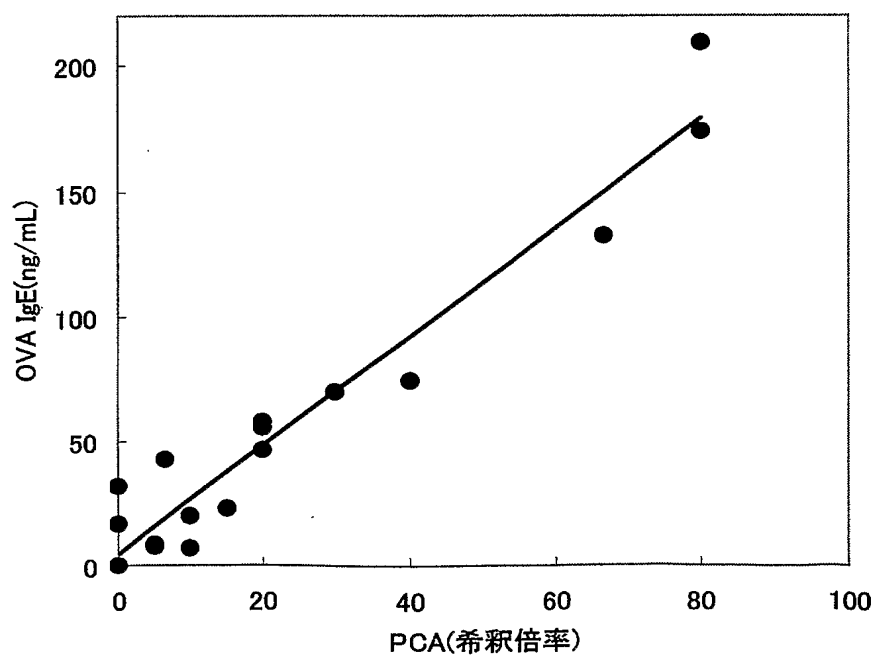
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 精製されたモルモット免疫グロブリンE画分、該画分を抗原として得られた特異性の高い抗モルモット免疫グロブリンE抗体、及び該抗体を含むモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬を提供すること。

【解決手段】 アレルゲンで感作されたモルモットの血液から免疫グロブリン画分を分離し、さらにこの画分を精製することにより、純度の高いモルモット免疫グロブリンE画分を得ることができる。該画分を抗原として使用すれば、モルモットの免疫グロブリンEに特異的な抗体を製造することができ、さらに、該抗体を含む免疫測定試薬によってモルモットの免疫グロブリンEを高い精度で測定することができる。

【選択図】 図 1

特願 2 0 0 4 - 2 8 9 9 3 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 2 9 1 2]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町 2 丁目 6 番 8 号

氏 名

大日本製薬株式会社